

# Pengaruh Aras Glycerol terhadap Motilitas dan Fertilitas Spermatozoa Ayam Kampung yang Dibekukan dengan Nitrogen Cair

(Effect of Glycerol Levels on the Motility and Fertility of Kampung Chicken Spermatozoa Frozen in Liquid Nitrogen)

Dadang Mulyadi Saleh dan Sugiyatno

Fakultas Peternakan Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto

**ABSTRACT:** The use of various levels of glycerol as a cryoprotective agent for freezing kampung chicken semen was examined with respect to intravaginal insemination. There was a significant ( $P < 0.05$ ) effect of various levels of glycerol (4, 8, 12 and 16 %) on motile spermatozoa, but there was no significant effect on fertility. It was concluded that the use of glycerol for preservation of kampung chicken semen in liquid nitrogen gave satisfactory cryopreservative results on motility of thawed kampung chicken spermatozoa, but failed to produce fertile eggs.

**Key Words:** Glycerol, kampung chicken, semen, fertility, motility, liquid nitrogen

## Pendahuluan

Dalam ilmu reproduksi, mengawinkan ternak dapat dilakukan secara kawin alam atau kawin buatan atau inseminasi buatan (IB). Pada umumnya ternak ayam kawin secara alamiah, tanpa bantuan manusia. Dengan perkawinan alam ini ternyata diperlukan pejantan yang banyak. Selain itu banyak betina yang subur dikawini oleh pejantan yang kuat atau dominan tapi kualitas spermanya rendah, sehingga fertilitasnya rendah, disamping itu penyebaran penyakit oleh pejantan akan cepat menyebar pula. Namun dengan IB kelemahan-kelemahan tersebut bisa diatasi. Selain itu, dengan IB dapat mengawinkan pejantan yang tidak bisa mengawini karena cacat, atau memang tidak bisa kawin secara alam. Jadi kawin silang seperti ayam hutan dan ayam kampung dengan IB bisa dilaksanakan dengan mudah.

IB pada ayam dengan menggunakan sperma segar, atau sperma segar yang diencerkan sudah banyak dilakukan, umumnya pada perusahaan ayam yang besar dan dikelola secara komersial. Namun inseminasi dengan menggunakan sperma beku belum banyak diaplikasikan secara luas, karena keberhasilan atau tingkat fertilitasnya masih rendah dibawah hasil kawin alam ataupun masih dibawah hasil inseminasi dengan menggunakan semen segar atau *Liquid semen* (Donoghue dan Wishart, 2000).

Sperma cair yang digunakan untuk inseminasi hanya tahan beberapa jam atau hari saja, sedangkan sperma beku waktu penggunaannya cukup lama hingga puluhan tahun. Dalam proses pembekuan dan *thawing*

spermatozoa akan banyak mengalami kerusakan atau kematian. Oleh karena itu, untuk menanggulangi akibat dari kerusakan atau kematian selama pembekuan dan *thawing* sperma perlu ditambah dengan *cryoprotectant* yang baik. Salah satu *cryoprotectant* yang sudah banyak digunakan dan bekerja baik seperti pada pembekuan semen sapi dan kerbau yaitu glycerol.

Banyak peneliti menyatakan bahwa pada pembekuan sperma ayam, glycerol terbukti dapat bekerja dengan baik, menjaga atau melindungi spermatozoa dari kerusakan. Namun, disayangkan ayam betina yang diinseminasi secara intravagina dengan sperma berglycerol tidak menghasilkan fertilisasi yang baik, bahkan sama sekali tidak terjadi fertilisasi, tetapi hal tersebut tidak terjadi pada inseminasi melalui *intrauterine* atau *intramagma*. Sifat *contraceptive* ini masih diperdebatkan. Bagi yang kontra pun hingga kini belum bisa mengungkapkan mekanisme atau aksi *contraceptive* dari glycerol itu.

Penelitian ini dirancang untuk membuktikan atau mengkaji pemakaian glycerol yang digunakan dalam pembekuan sperma ayam terhadap motilitas dan kemampuan spermatozoa dalam membuahi.

## Metode Penelitian

### Materi Penelitian

Penelitian dilaksanakan di kandang percobaan dan Laboratorium Fisiologi dan Reproduksi, Fakultas Peternakan, Universitas Jenderal Soedirman Purwokerto.

Hewan percobaan yang digunakan terdiri dari 8 ekor ayam kampung jantan umur sekitar 12 – 18 bulan, dan 40 ekor ayam betina ISA brown umur 45 minggu. Semua ayam ditempatkan dalam kandang individu. Air minum diberikan *ad libitum*, pakan yang diberikan untuk ayam jantan terdiri dari konsentrat, jagung dan dedak dengan perbandingan 1:2:5 sebanyak 150 g/ekor/hari yang mengandung ME 2250 kkal/kg, dan protein 12,50%, pakan untuk ayam betina terdiri dari konsentrat, jagung dan dedak dengan perbandingan 3:4:3 sebanyak 120 gram/ekor/ hari yang mengandung ME 2795 kkal/kg dan protein 18%.

Bahan yang digunakan terdiri dari sperma ayam kampung, pengencer Tris-kuning telur dengan komposisi pengencer : 3,028 g Tris (*hydroxymethyl*) aminomethan, 1,675 g asam sitrat, 12,5 g D (-) fruktosa, 27,90 g raffinosa, 100,000 IU penisilin-G, 50 mg streptomycin sulfat *ad* 100 ml aquabidestilata (Saleh, 2004). Bahan lain yang digunakan adalah kuning telur ayam ras, glycerol dan nitrogen cair.

Peralatan yang digunakan meliputi, timbangan mikro, tabung reaksi, gelas ukur, tabung koleksi sperma, Fluke *thermocouple thermometer*, straw 0,5 ml, syringe, hemositometer, obyek glass, *cover glass*, gunting, mikroskop, styrofoam dan kontainer.

### Cara Penelitian

Setiap pejantan diambil spermanya sebanyak 3 kali dengan interval 3 hari. Pengambilan sperma menggunakan teknik *massage* yang dikembangkan oleh Burrows dan Quinn (1937). Sperma yang dikeluarkan ditampung dalam tabung berskala kemudian segera dievaluasi secara makroskopis dan mikroskopis. Pemeriksaan makroskopis meliputi pemeriksaan volume, warna dan kekentalan. Pemeriksaan mikroskopis meliputi pemeriksaan gerak massa, gerak progresif individu, konsentrasi, persentase hidup dan morfologi spermatozoa.

Setelah dievaluasi, sperma segar dari masing-masing individu ayam jantan yang dinyatakan baik atau memenuhi persyaratan untuk pembekuan, segera dicampur menjadi satu tabung (*pooled* sperma segar), kemudian dibagi ke dalam 4 tabung atau 4 kelompok perlakuan yakni :  $T_1$  = Tris - kuning telur + 4 persen glycerol;  $T_2$  = Tris - kuning telur + 8 persen glycerol;  $T_3$  = Tris - kuning telur +12 persen glycerol; dan  $T_4$  = Tris - kuning telur +16 persen glycerol.

Setelah itu setiap tabung tersebut segera diencerkan dengan masing-masing pengencer secara perlahan dan merata dengan perbandingan 1:1 (v/v) tidak lama kemudian ditambah lagi pengencer hingga sesuai dengan pernitungan yang menghendaki setiap

dosis IB mengandung sekitar 300 juta spermatozoa dalam *straw* volume 0,5 ml. Pelaksanaan penyimpanan sperma segar, pencampuran sperma dan pengencer dilakukan pada temperatur yang sama, yaitu sekitar 5°C. Empat puluh lima menit kemudian (waktu ekuilibrasi) sperma + pengencer dikemas ke dalam straw yang sudah diberi label sesuai dengan perlakuan, dan ditutup dengan *sealing powder* setelah itu *straw* tersebut dibiarkan sekitar 5 menit didalam air es yang bersuhu sekitar 4–5 °C.

Pembekuan dilakukan dengan cara menempatkan *straw* yang telah berisi sperma 17 cm di atas permukaan nitrogen cair selama 21 menit dari + 5°C hingga -47,20°C (-2,48 °C/menit) di dalam Styrofoam yang ditutup rapat, selanjutnya *straw* ditempatkan 3 cm di atas permukaan nitrogen cair selama 7 menit, dari -47,20°C hingga -145°C (-13,9°C/menit). Setelah itu *straw* dimasukkan ke dalam nitrogen cair dan disimpan di dalam kontainer. Pada hari berikutnya sperma beku diperiksa dan siap untuk diinseminasikan. Untuk mengetahui motilitas, dua *straw* sperma beku dari setiap perlakuan di *thawing* terlebih dahulu, dengan cara mengangin-anginkan *straw* atau dibiarkan dalam suatu tempat pada temperatur ruang, selama 3-4 menit, kemudian diamati dibawah mikroskop 10 x 40. Untuk menguji fertilitas, setiap satu *straw* sperma beku yang telah dithawing diinseminasikan secara intravagina ke setiap ayam betina sesuai dengan perlakuan yang telah ditentukan, pada sore hari sekitar pk 15.00.

Koleksi telur mulai hari kedua hingga hari ke delapan setelah inseminasi. Setiap 5 hari telur-telur tersebut dimasukkan ke dalam mesin tetas. Pada hari ketujuh setelah masuk mesin tetas, seluruh telur di teropong (*candling*). Telur dinyatakan fertil apabila dalam pemeriksaan nampak embrio, kecil hitam bergerak-gerak, atau nempel pada cangkang telur atau telur nampak banyak pembuluh darah kemerah-merahan. Bagi telur yang daya tunasnya meragukan, maka telur tersebut dipecah, untuk lebih memastikan ada perkembangan embrio apa tidak. Bila tidak nampak ada perkembangan embrio atau kalau dipecah kuning telurnya masih utuh, maka telur tersebut dikategorikan tidak tertunas. Untuk menghitung fertilitas yaitu jumlah telur yang fertile (tertunas) dibagi dengan jumlah telur yang ditetaskan kali seratus persen. Perhitungan fertilitas antar perlakuan dilakukan pada peneluran hari ke 2 – 8.

### Analisis Data

Data dianalisis dengan analisis ragam menggunakan Rancangan Acak Lengkap pola searah,

dengan sepuluh ekor ayam betina ( $n = 10$ ) sebagai ulangan. Perbedaan rata-rata antar perlakuan diuji dengan uji beda nyata jujur (Steel dan Torrie, 1993).

## Hasil dan Pembahasan

Hasil evaluasi pada *pooled* sperma segar ayam kampung sebagai berikut: rata-rata motilitas spermatozoa sebesar  $77,14 \pm 4,87\%$ , spermatozoa hidup  $86,00 \pm 1,20\%$ , konsentrasi spermatozoa  $3,51 \pm 0,18$  milyar per ml dan spermatozoa abnormal  $8,50 \pm 1,30\%$ .

Konsentrasi spermatozoa yang diperoleh tidak jauh berbeda dari yang dilaporkan Saleh (2004), yang mengatakan bahwa konsentrasi semen ayam lokal di Philippine adalah 3-4 milyar/ml. Hasil ini lebih tinggi dari yang dilaporkan oleh Nataamijaya *et al.* (2005) yaitu  $1,80 \pm 0,39$  milyar/ml.

Abnormalitas spermatozoa ayam kampung ( $6,50 \pm 0,90\%$ ) lebih tinggi bila dibandingkan dengan yang dilaporkan oleh Nataamijaya *et al.* ( $4,97 \pm 1,42\%$ ). Menurut banyak peneliti abnormalitas yang lebih dari 20% biasanya jarang digunakan untuk inseminasi buatan. Perbedaan-perbedaan pada kualitas semen dari berbagai hasil penelitian di atas, dimungkinkan karena banyak faktor seperti bobot ayam, umur, frekuensi penampungan, jumlah sampel penelitian, waktu dan juga pakan. Secara keseluruhan kualitas semen yang dipakai dalam penelitian ini baik, memenuhi syarat untuk inseminasi. Pengaruh aras glycerol terhadap motilitas semen beku dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Rataan motilitas dan fertilitas semen beku

Perlakuan	Motilitas (%)	Fertilitas (%)
T <sub>1</sub> (4% glycerol)	$38,00 \pm 4,47^a$	0
T <sub>2</sub> (8% glycerol)	$48,00 \pm 2,74^b$	0
T <sub>3</sub> (12% glycerol)	$50,00 \pm 6,32^b$	0
T <sub>4</sub> (16% glycerol)	$52,00 \pm 4,47^b$	0

<sup>a,b</sup> Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan ada perbedaan pada  $P < 0,05$ .

Motilitas spermatozoa setelah semen beku dithawing untuk masing-masing perlakuan T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub> dan T<sub>4</sub> adalah  $38,00 \pm 4,47$ ;  $48,00 \pm 2,74$ ;  $50,00 \pm 6,32$  dan  $52,00 \pm 4,47\%$ , secara berurutan. Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa perlakuan berpengaruh nyata ( $P < 0,05$ ). Nilai rata-rata motilitas terendah diperoleh dari semen dengan 4% glycerol ( $38,00 \pm 4,47\%$ ), dan nilai ini berbeda nyata ( $P < 0,05$ ) lebih rendah dibandingkan dengan nilai rata-rata motilitas dari ketiga perlakuan lainnya. Nilai rata-rata

motilitas tertinggi diperoleh dari perlakuan T<sub>4</sub>, dengan level glycerol 16% ( $52,00 \pm 4,47\%$ ). Nilai rata-rata motilitas tersebut tidak menunjukkan perbedaan yang nyata dengan nilai rata-rata motilitas dari perlakuan T<sub>2</sub> dan T<sub>3</sub> ( $48,00 \pm 2,74$  dan  $52,00 \pm 4,47\%$ ).

Hasil penelitian ini tidak jauh berbeda dengan hasil penelitian Saleh (2004) penggunaan glycerol 3,50 hingga 10,50% menghasilkan motilitas spermatozoa yang baik sekitar 40%, dan juga mendukung penelitian Westfall dan Harris (1975) penggunaan glycerol level 8 sampai 16% menghasilkan motilitas spermatozoa yang lebih baik daripada motilitas spermatozoa yang menggunakan glycerol dibawah 8 persen atau di atas 16 persen. Rendahnya angka motilitas spermatozoa pada perlakuan semen yang diberi 4% glycerol setelah dibekukan dan dithawing ini menunjukkan bahwa penggunaan 4% glycerol tidak memberikan perlindungan yang cukup bagi spermatozoa sewaktu pembekuan dan saat *thawing*, sehingga dampaknya kristal-kristal es yang terbentuk lebih banyak, akibatnya membran sel, lebih banyak pada organel-organel spermatozoa, khususnya mitokondria yang rusak, sehingga proses oksidasi terhambat, metabolisme terhambat dan ATP atau energi yang terbentuk juga terhambat.

Fertilitas telur yang dikoleksi dari hari peneluran kedua hingga ke-8 setelah inseminasi dapat dilihat pada Tabel 1. Rataan fertilitas dari keempat perlakuan level glycerol tidak menghasilkan telur fertil. Hal ini mendukung penelitian sebelumnya antara lain Brown dan Harris (1963), Neville *et al.* (1971), Mitchell dan Buckland (1976) bahwa glycerol dengan konsentrasi di atas 2% dalam volume semen dan pengencer berakibat negatif pada fertilitas, sedangkan pada semen ayam yang mengandung glycerol lebih dari 5% baik pada semen segar ataupun semen yang dibekukan, diinseminasikan melalui intra-vagina gagal menghasilkan telur yang fertile, tetapi tidak pada inseminasi melalui intrauterine atau intramagma.

Bila dilihat dari penilaian motilitas seperti yang telah diuraikan di atas, semestinya spermatozoa hasil penelitian ini dapat menghasilkan telur yang dibuahi atau fertil. Namun kenyataannya spermatozoa yang diberi perlakuan glycerol baik dalam bentuk cair ataupun dibekukan bila diinseminasikan via intra-vagina tidak menghasilkan telur fertil yang memuaskan, bahkan bisa nol. Aksi *contraceptive* glycerol dalam vagina ini sampai sekarang masih diperdebatkan (Hammerstedt dan Graham, 1992).

Untuk meminimalkan dampak glycerol terhadap fertilitas beberapa peneliti seperti Tajima *et al.* (1989), Buss (1993) mencoba membuang glycerol pada semen

beku setelah dithawing melalui waktu dialisis 120 menit hingga kandungan residu glycerol sekitar 0,2 - 0,3% dan hasilnya di atas 60 persen telur yang dikoleksi hingga 10 hari dibuahi atau fertil.

### Kesimpulan

Penambahan glycerol 8 dan 16 persen dalam pengencer Tris-kuning telur dapat digunakan untuk pembekuan sperma ayam, mengingat angka motilitas sperma beku setelah *dithawing* cukup tinggi, namun demikian tingginya angka motilitas tersebut bukan jaminan keberhasilan suatu inseminasi.

### Daftar Pustaka

- Brown, J.E. and G.C. Harris, 1963. The Influence of glycerol equilibration time on the metabolism, motility and fertility of frozen chicken spermatozoa. *Poultry Science* 42: 377-380.
- Buss, E.G., 1993. Cryopreservation of rooster semen. *Poultry Science* 72: 944-954.
- Donoghue, A.M. and G.J. Wishart, 2000. Storage of poultry semen. *Journal of Animal Reproduction Science* 62: 213-232.
- Hammerstedt and J.K. Graham, 1992. Cryopreservation of poultry sperm: The enigma of glycerol. *Cryobiology* 29: 26-38.
- Mitchell, R.L. and R.B. Buckland, 1976. Fertility of frozen chicken semen after intravaginal and intrauterine inseminations using various concentrations and equilibration times of dimethylsulfoxide and a range of freezing and thawing rates. *Poultry Science* 55: 2195-2200.
- Nataamijaya, A.G., A. Sutisna dan Sri Rejeki, 2005. Kuantitas dan kualitas semen ayam kampung dan arab yang mendapat suplemen vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol). *Animal Production* 7(2): 74 - 80.
- Neville, W.J., J.W. Macpherson and B. Reinhart, 1971. The Contraceptive action of glycerol in chickens. *Poultry Science* 50: 1411-1415.
- Saleh, D.M., 2004. Optimization of Semen Processing and Cryopreservation Techniques in Philippine Native Roosters (*Gallus gallus domesticus* L). *Dissertation*. Institute of Animal Science, University of the Philippines Los Banos, Philippines.
- Steel, R.G.D. and J.H. Torrie, 1993. *Principle and Procedures of Statistics*. Terjemahan: Sumantri B., *Prinsip dan Prosedur Statistika*. PT. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Tajima, A., E.F. Graham, and D.M. Hawkins, 1989. Estimation of the relative freezing ability of frozen chicken spermatozoa using heterospermic competition method. *Journal of Reproduction and Fertility* 85: 1-5.
- Westfall, F.D. and G.C. Harris Jr., 1975. The ability of Cryopreservatives to prevent motility loss and freeze-thawed damage to acrosome of chicken spermatozoa. *Cryobiology* 12: 89-92.